

Renata Loper Corrêa

**USO DE ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*  
MARCADAS COM O GENE REPÓRTER *gusA* NO ESTUDO  
DA INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA**

Monografia apresentada ao curso de  
Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná, como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Emanuel Maltempi de  
Souza

Curitiba  
2004

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	i
<b>LISTA DE TABELAS</b>	ii
<b>RESUMO</b>	iii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	6
1.1. Fixação Biológica de Nitrogênio	6
1.2. <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	10
<b>2. OBJETIVOS</b>	11
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	12
3.1. Estirpes e plasmídeos	12
3.2. Construção de estirpes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> mutantes	12
3.2.1. Mini-preparação do transposon	12
3.2.2. Preparo de células eletrocompetentes de <i>H. seropedicae</i>	13
3.2.3. Inserção do transposon no DNA bacteriano e seleção das colônias mutantes	14
3.3. Plantas utilizadas	14
3.4. Desinfecção de sementes	14
3.5. Germinação	15
3.6. Inoculação	15
3.7. Condições de cultivo	15
3.8. Estudos de colonização	17
3.9. Contagem de microrganismos	18
3.10. Curvas de crescimento de microrganismos	18
3.11. Crescimento em nitrato	19

3.12. Determinação da concentração de espectinomicina inibitória do crescimento de <i>H. seropedicae</i> .....	19
3.13. Ensaio de nitrogenase.....	19
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>20</b>
4.1. Construção de estirpes mutantes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> expressando constitutivamente o gene <i>gusA</i> .....	20
4.2. Detecção de atividade de $\beta$ -glucuronidase nas estirpes mutantes.....	21
4.3. Atividade de nitrogenase e crescimento na presença de nitrato.....	22
4.4. Curvas de Crescimento.....	23
4.5. Colonização de plantas milho, trigo, sorgo, arroz, tomate e feijão por estirpes de <i>H. seropedicae</i> marcadas com o gene <i>gusA</i> .....	25
4.6. Contagem de microrganismos.....	30
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>33</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>34</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Expressão da $\beta$ -glucuronidase nos mutantes ZMLRC e ZALRC.....	20
<b>FIGURA 2:</b> Expressão da $\beta$ -glucuronidase nos mutantes ZMLRC e ZALRC.....	21
<b>FIGURA 3:</b> Crescimento das estirpes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> utilizando nitrato como fonte de nitrogênio.....	23
<b>FIGURA 4:</b> Curva de crescimento das estirpes selvagem ZM152 e mutante ZMLRC1.....	24
<b>FIGURA 5:</b> Curva de crescimento das estirpes selvagem ZA95 e mutante ZALRC1.....	25
<b>FIGURA 6:</b> Visualização da colonização superficial de raiz de gramíneas por <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	26
<b>FIGURA 7:</b> Visualização da colonização superficial de raiz de gramíneas por <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	27
<b>FIGURA 8:</b> Visualização da colonização superficial de plântulas de feijão por <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	28
<b>FIGURA 9:</b> Visualização da colonização superficial de plântulas de tomate por <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	29
<b>FIGURA 10:</b> Bactérias endofíticas do tomate inoculado com a estirpe mutante ZALRC1.....	32

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Estirpes e plasmídeos utilizados.....	12
TABELA 2: Colonização endofítica de feijão por <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	31
TABELA 3: Colonização endofítica de tomate por <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	31

## RESUMO

Para estudar a interação de *H. seropedicae* com plantas hospedeiras, foram construídas estirpes de *H. seropedicae* contendo e expressando constitutivamente o gene *gusA* e resistentes à espectinomicina. Nestas construções o mini-transposon foi introduzido no cromossomo das estirpes ZM152 e ZA95 de *H. seropedicae* por eletroporação. As estirpes mutantes obtidas foram denominadas ZMLRC (derivada da estirpe selvagem ZM152) e ZALRC (derivada da estirpe selvagem ZA95). Os mutantes obtidos não diferiram das estirpes selvagens nas análises quanto ao crescimento em meio líquido NFbHPN, crescimento utilizando nitrato como fonte de N e atividade de nitrogenase. As estirpes mutantes foram capazes de colonizar a superfície de plântulas de milho, trigo, sorgo, arroz, tomate e feijão e colonizaram endofiticamente plantas de tomate e feijão. A presença da bactéria foi evidenciada após incubação com o substrato da beta-glucuronidase, X-gluc.

## 1. INTRODUÇÃO

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria diazotrófica endofítica, encontrada nas raízes e partes aéreas de várias plantas, incluindo espécies vegetais economicamente importantes. A colonização da planta por *H. seropedicae* não causa danos visíveis aos hospedeiros. Como não há formação de estruturas simbióticas nas interações entre gramíneas e *H. seropedicae*, diferente do que acontece nas associações entre *Rhizobium* e leguminosas, há dificuldades em estudar os mecanismos de interação planta-microrganismos endofíticos. Assim, o desenvolvimento de métodos apropriados, como a utilização de genes-repórteres, para localizar e analisar a expressão dos genes bacterianos durante a interação é de crucial importância para um melhor entendimento sobre as funções dos endófitos.

Depois da água a disponibilidade de nitrogênio é um dos fatores mais críticos para o crescimento e produção vegetal. Com a revolução verde, ocorrida na década de 60, a produção de cereais foi intensificada pela resposta destas plantas à excessivas doses de fertilizantes nitrogenados aplicadas aos solos de cultivo (Boddey et al., 1995). Estas quantidades de nitrogênio resultaram no aumento da produção de alimentos, mas também apresentaram aspectos negativos. Os problemas abrangem a poluição de águas subterrâneas e da atmosfera, pela liberação de  $\text{NH}_3$  e  $\text{NO}_2$ , altos custos de produção, além da queima de combustível fóssil utilizados na sua produção (Döbereiner, 1992a).

### 1.1. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

As plantas não podem usar o nitrogênio atmosférico, exceto com a ajuda de bactérias fixadoras de nitrogênio. Por mais de 100 anos a simbiose entre plantas leguminosas e microrganismos tem sido considerada como a forma mais eficiente de

transformar o nitrogênio atmosférico em nutriente para plantas. Entretanto, a descoberta de várias espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio, isto é diazotróficas, em associações endofíticas naturais com raízes de gramíneas (Döbereiner, 1988), aumentou o interesse em estender a fixação biológica de nitrogênio para cereais.

A fixação biológica de nitrogênio é o processo enzimático pelo qual o nitrogênio atmosférico é reduzido a amônio, forma de nitrogênio metabolizável pela maioria dos organismos vivos. Apenas algumas espécies de bactérias são capazes de realizar este processo, entre elas o *Herbaspirillum seropedicae*.

A fixação biológica é uma alternativa de baixo custo ao uso de fertilizantes nitrogenados químicos. Neste caso a planta é inoculada com bactérias fixadoras de nitrogênio associativa que reduz o  $N_2$  atmosférico a  $NH_4^+$ . Uma parte do nitrogênio fixado é utilizado pela planta associada. Este tipo de associação não resulta em produtividade tão alta quanto aquela obtida com adubação química, mas possui as seguintes vantagens:

1. Não polui a atmosfera com liberação de gás  $NO_2$ ;
2. Não polui a aquíferos com  $NO_3^-$ ;
3. É barato e acessível a agricultores em regime de agricultura familiar;
4. Estimula o crescimento vegetal pela produção de fitohormônios.

As interações planta-microrganismos fornecem sistemas modelos para estudos de processos fundamentais em plantas e/ou microrganismos. Como exemplo de tais sistemas, Jackson & Taylor, (1996) citam a percepção e transdução de sinais, o controle do ciclo celular e a diferenciação celular. As interações plantas-microrganismos mais estudadas são aquelas nas quais bactérias ou fungos entram em simbiose mutualística e benéfica com plantas superiores. Estas interações são caracterizadas pela sua complexidade e



especificidade, sendo também de grande importância para a produtividade agrícola mundial.

O crescimento de plantas promovido por bactérias fixadoras de  $N_2$  associadas às raízes dos vegetais, ou seja, rizobactérias diazotróficas, é um fenômeno amplamente difundido embora poucas espécies tenham sido bem estudadas. As bactérias formadoras de nódulos nas raízes são os microrganismos promotores de crescimento mais estudados, apesar de se associarem a um número restrito de plantas hospedeiras (Torch & Vanderleyden, 1996).

Espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* são capazes de associarem-se em simbiose altamente organizada com a planta hospedeira. Esta associação é hospedeiro-específica (Smith, 1992; Verma et al., 1992) e a maioria dos hospedeiros são plantas leguminosas (*Fabaceae*) (Bottmley, 1992; Young & Johnston, 1989).

Esta interação se inicia com troca de sinais entre os parceiros e reconhecimento do simbionte, seguido de adesão do microrganismo aos pêlos radiculares da planta. Os pêlos da raiz sofrem uma deformação e a bactéria invade a planta (Mylona et al., 1995).

Neste processo simbiótico, estruturalmente complexo, a planta elabora uma nova estrutura morfogênética denominada nódulo. O desenvolvimento do nódulo consiste em vários estágios determinados pela ação de produtos de conjuntos de genes da planta hospedeira e da bactéria simbionte (Schloter et al., 1997). Quando a bactéria se diferencia para uma forma endossimbiótica conhecida como bacteróide (Mylona et al., 1995), a nitrogenase, enzima que catalisa a redução do nitrogênio, é sintetizada.

Este tipo de simbiose é claramente vantajoso para a planta, pois permite o crescimento vegetal em solos pobres em nitrogênio fixado. Com relação à bactéria, existem especulações em relação à vantagem obtida com a associação (Long & Staskawicz, 1993).

O estado altamente diferenciado que a bactéria assume durante a simbiose (bacteróide) parece ser terminal, contudo a vantagem reprodutiva dentro do nódulo é consideravelmente maior do que a situação de vida da bactéria no solo (Triplett & Sadowsky, 1992).

Os dois organismos envolvidos na simbiose se diferenciam para produzir uma cooperação metabólica: a bactéria fixa dinitrogênio em amônio e a planta assimila amônio, suprimindo a bactéria com carboidratos (Werner, 1992).

Outro grupo de rizobactéria estudado compreende os microrganismos diazotróficos endofíticos. Bactérias endofíticas são aquelas que podem ser isoladas da superfície desinfetada do tecido vegetal ou extraídas do interior da planta, mas não causam danos visíveis à planta hospedeira (Hallmann et al., 1997).

Ao contrário do que ocorre em simbioses entre espécies de *Rhizobium* e leguminosas, as interações entre gramíneas e *H. seropedicae* não resultam na formação de estruturas simbióticas como os nódulos radiculares. A falta de um fenótipo claro resultante da associação dificulta o estudo dos mecanismos de interação planta-microrganismos endofíticos.

O isolamento de *Azotobacter* spp das raízes de arroz (Sen, 1929) resultou na descoberta de um novo tipo de associação onde a planta pode se beneficiar da associação com bactérias diazotróficas que vivem em suas raízes. A partir daí, um grande número de bactérias diazotróficas tem sido isolado de gramíneas tropicais, incluindo espécies de *Azospirillum* (Baldani & Döbereiner, 1980; Baldani et al., 1981; Ladha et al., 1997), *Herbaspirillum* (Baldani et al., 1986) e *Burkholderia* (Bevivino et al., 1994), entre outras.

As principais pesquisas que envolvem bactérias endofíticas e gramíneas buscam quantificar e identificar possíveis efeitos benéficos que estes microrganismos podem proporcionar às plantas. Estes estudos objetivam determinar o efeito da inoculação na

planta; o papel que a bactéria e a planta desempenham quando em associação e a especificidade da associação, considerando o ambiente (Didonet, 1998).

### 1.2. *Herbaspirillum seropedicae*

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria diazotrófica endofítica obrigatória, que pode ser encontrada em raízes, hastes e folhas de várias espécies de Poaceae, como arroz e cana-de-açúcar, sem causar danos visíveis aos hospedeiros (Baldani et al., 1986; Olivares et al., 1996). Sua taxa de sobrevivência no solo é baixa, habitando o interior do tecido vegetal (Baldani et al., 1997).

Pertence à divisão  $\beta$  da classe das proteobactérias, são fixadores de nitrogênio, microaeróbicas, gram-negativas, com 0,6 a 0,7  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 1,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  de comprimento.

*H. seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* produzem giberelinas e IAA (ácido indol-acético) (Bastian et al., 1998). Estes resultados explicam, em parte, os efeitos benéficos das bactérias endofíticas na planta hospedeira.

Apesar das evidências de que o aumento na produção seja devido primeiramente a produção de hormônios pela bactéria, Bashan & Holguin (1997) acreditam na possibilidade de que bactérias inoculadas contribuam consideravelmente com a fixação de nitrogênio nestes incrementos.

*Herbaspirillum seropedicae* desperta grande interesse econômico, pois pode ser utilizado como biofertilizante, reduzindo o custo com fertilizantes nitrogenados.

## 2. OBJETIVOS

Neste trabalho foi estudada a interação entre o microrganismo diazotrófico endofítico *Herbaspirillum seropedicae* e as gramíneas hospedeiras arroz, milho, sorgo, trigo. Também foi estudada a interação de *H. seropedicae* com as dicotiledôneas tomate e feijão. Os objetivos específicos foram:

- Obter estirpes de *Herbaspirillum seropedicae*, expressando constitutivamente o gene-repórter *gusA*, por mutagênese aleatória com mini-transposon;
- Monitorar a colonização de plântulas de arroz, milho, sorgo, trigo, tomate e feijão inoculadas pelas estirpes de *H. seropedicae* (*gusA*);
- Caracterizar os sítios de colonização de *Herbaspirillum seropedicae* em plântulas arroz, milho, sorgo, trigo, tomate e feijão.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ESTIRPES E PLASMÍDEOS

As estirpes de bactérias e plasmídeos utilizados estão listados na tabela 1.

**Tabela 1**

Estirpes	Principais características	Referência / Fonte
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
ZA95	Nif <sup>+</sup>	BALDANI <i>et al.</i> , 1986
ZM152	Nif <sup>+</sup>	BALDANI <i>et al.</i> , 1986
ZALRC1	Spm <sup>R</sup> , Nif <sup>+</sup> , <i>gusA</i> <sup>C</sup>	Este trabalho
ZMLRC1	Spm <sup>R</sup> , Nif <sup>+</sup> , <i>gusA</i> <sup>C</sup>	Este trabalho
<i>Escherichia coli</i>		
S17		SIMON <i>et al.</i> , 1984
Plasmídeo		
mTn5SS <i>gusA</i> 20	Spm <sup>R</sup> , <i>gusA</i> <sup>C</sup>	WILSON <i>et al.</i> , 1995

#### 3.2. COSTRUÇÃO DE ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae* MUTANTES

##### 3.2.1. Mini-preparação do transposon

O mini-transposon foi preparado segundo a técnica de lise alcalina (Sambrook et al., 1989).

As células de *E. coli*, estirpe S17, foram crescidas em meio LB, a 37°C, sob agitação de 200 rpm, por um período de 12 h. Um mililitro e meio de cultura foram coletados em tubos tipo eppendorf e centrifugados por 1 minuto a 13000 rpm. Foi

descartado o meio sobrenadante e as células ressuspensas em 150 µL de tampão GET (EDTA 10 mmol/L, glucose 50 mmol/L, Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8,0). Em seguida, 150 µL de solução de lise (SDS 1%, NaOH 200 mmol/L) foram adicionados para rompimento das células. Esta mistura foi mantida a temperatura ambiente por 5 minutos. Cento e cinquenta microlitros de tampão KacF (ácido fórmico 1,8 mol/L, acetato de potássio 3 mol/L, pH 5,0) foram adicionados à mistura. Após incubação em banho de gelo por 5 minutos, foram adicionados 50 µL de fenol clorofórmio à mistura, que foi homogeneizada e centrifugada a 13000 rpm, durante 10 minutos. A fase aquosa foi coletada e transferida para tubos tipo eppendorf novos que continham 1 mL de etanol absoluto. Esta mistura foi novamente homogeneizada e depois de um repouso de 25 minutos, foi centrifugada durante 10 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado em 1 mL de etanol 80%, duas vezes. O precipitado, contendo o DNA plasmidial, foi seco em bomba a vácuo e dissolvido em 20 µL de água estéril contendo 20 µg/mL de RNase.

### **3.2.2. Preparo de células eletrocompetentes de *H. seropedicae***

Cento e vinte mililitros de cultura de *H. seropedicae* foram crescidos por 12 horas, a 30°C, sob agitação de 120 rpm. Essas culturas foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos, a 0°C. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado foi lavado com água estéril gelada e centrifugado a 3000 rpm, durante 10 minutos, a 0°C. Novamente o sobrenadante foi desprezado e foi acrescentado 50 µL de glicerol 10% às células. Estas foram separadas em alíquotas de 20 µL e acondicionadas em freezer a -70°C.

### **3.2.3. Inserção do transposon no DNA bacteriano e seleção das colônias mutantes**

O DNA plasmidial intacto foi transferido para estirpes *H. seropedicae* através de eletroporação de células eletrocompetentes.

O antibiótico espectinomicina foi usado para seleção das colônias com transposon. Para comprovar a inserção do gene-repórter nas estirpes selvagens, as colônias resultantes da eletroporação foram transferidas para placas contendo meio NFbHPN sólido e X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronídeo) (30 $\mu$ g/mL).

### **3.3. PLANTAS UTILIZADAS**

Neste trabalho foram utilizadas sementes das gramíneas: arroz (*Oryza sativa*) variedade IAPAR-63, milho (*Zea mays*) variedade BRS-3133, sorgo (*Sorghum bicolor*) variedade Agrocere, trigo (*Triticum aestivum*) variedade BRS-208; e das dicotiledôneas: tomate (*Lycopersicum esculentum*) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L). As sementes de arroz foram obtidas do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e as sementes de milho, sorgo e trigo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). As sementes de tomate e feijão foram adquiridas comercialmente na casa Boutin. As sementes permaneceram acondicionadas em geladeira até o uso nos experimentos.

### **3.4. DESINFECÇÃO DE SEMENTES**

As sementes de milho, trigo, sorgo, arroz e tomate foram desinfetadas superficialmente por imersão em etanol 95% seguida de imersão em hipoclorito de sódio (10%) durante 5 minutos. Posteriormente foram lavadas em água destilada por 4 vezes.

As sementes de feijão foram desinfetadas por imersão em etanol 95%, seguido de imersão em hipoclorito de sódio (10%) com Tween 0,002% durante 10 min por 2 vezes, e 1 vez por 5 minutos. Após cada imersão em hipoclorito de sódio com Tween 0,002%, as sementes foram lavadas 5 vezes em água destilada estéril, cada lavagem durando 1 minuto.

### 3.5. GERMINAÇÃO

Após a desinfecção superficial as sementes de milho, trigo, arroz, sorgo e feijão foram pré-germinadas em placas de petri contendo ágar-água (1%) ou em placas de petri contendo papel absorvente e água destilada durante 48 horas no escuro. As sementes de tomate permaneciam no escuro por 4 dias.

### 3.6. INOCULAÇÃO

As plântulas foram inoculadas com 1mL ( $10^8$  células/mL) de cultura de *Herbaspirillum seropedicae*, crescida por 16 horas, nas plântulas contidas em placas de petri e incubadas por 1 minuto. Em seguida as plântulas foram transferidas para tubos, vasos ou papel e acondicionadas em câmara de cultivo com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 30°C.

### 3.7. CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *H. seropedicae* utilizadas para serem inoculadas nas plantas foram crescidas em meio líquido NFbHPN, a 30°C, sob agitação de 120 rpm. Em meio semi-sólido (0,175% de ágar) e sólido (1,5% de ágar), os frascos e placas foram mantidos sem agitação e incubados em estufa a 30°C. O meio NFbHPN apresenta a seguinte composição por litro:



MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1g
Malato de Sódio	5,0 g
CaCl <sub>2</sub>	20,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,0 g
Ácido Nitrilo Triacético	56,0 mg
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	20,0 mg
Biotina	0,1 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	2,0 mg
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	2,4 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8 mg
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,08 mg
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,24 mg
Mistura de fosfatos (20X)	50 mL
NH <sub>4</sub> Cl (1,0 mol/L)	20 mL

A mistura de fosfatos (20X) é composta por KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (159,5 g/L) e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (17,8 g/L), pH 6,0.

Os antibióticos usados foram espectinomicina (800µg/mL), ampicilina (250 µg/mL) e estreptomicina (80 µg/mL).

As plântulas foram transplantadas para papel, vasos ou tubos contendo solução nutritiva e vermiculita estéreis, conforme experimento. A solução nutritiva utilizada apresenta a seguinte composição por litro (Egener et al., 1999) e pH 6,8.

MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,026 g
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,012 g
NaMoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	4 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3 mg
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,2 mg
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,1 mg
Fe EDTA	13 mg
Malato 20%	5 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g

As plantas crescidas em vasos contendo vermiculita eram irrigadas periodicamente com água destilada estéril.

### 3.8. ESTUDOS DE COLONIZAÇÃO

A falta de um fenótipo visível, resultante da associação entre *H. seropedicae* e plantas hospedeiras, torna necessário o uso de ferramentas que possibilitem o estudo desta interação. A marcação de estirpes de *H. seropedicae* com o gene *gusA* (codifica para a  $\beta$ -

glucuronidase de *E. coli*) permitiu o acompanhamento da colonização. A atividade de  $\beta$ -glucuronidase foi monitorada usando X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronídeo) como substrato. Para tanto, as plantas foram lavadas cuidadosamente em solução salina tamponada para remover restos de vermiculita ou meio de cultivo e então coradas em tampão de cacodilato de sódio 50mmol/L, pH 7,5, contendo 0,5 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronídeo (X-gluc) (VANDE BROEK *et al.*, 1993; HUREK *et al.*, 1994).

### 3.9. CONTAGEM DE MICRORGANISMOS

A quantificação das bactérias foi realizada após desinfecção superficial das plantas de tomate e feijão com etanol (95%) por 30 s, seguido de hipoclorito de sódio (10%) por 5 min e 4 lavagens em água destilada estéril. Em seguida foram triturados em 1 mL de meio NFbHP e então diluídos em série ( $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ). As diluições (0,2 mL) foram plaqueadas em meio NFbHPN, contendo antibiótico adequado. As placas referentes à diluição  $10^{-5}$  tiveram acréscimo de X-gluc (30  $\mu$ g/mL). A contagem foi feita após 48h de incubação em estufa a 30°C.

### 3.10. CURVAS DE CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS

Os mutantes obtidos foram crescidos em meio líquido com NFbHPN, sob agitação de 120 rpm e 30°C e comparados às estirpes selvagens. As estirpes foram crescidas durante três, seis, nove e doze horas e o crescimento foi determinado pela absorbância a 600nm.

### 3.11. CRESCIMENTO EM NITRATO

As estirpes mutantes e selvagens foram crescidas em meio sólido com NFbHP, sendo adicionado nitrato de sódio (10 mmol/L) como única fonte de nitrogênio.

### 3.12. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPECTINOMICINA INIBITÓRIA DO CRESCIMENTO DE *H. seropedicae*

Para determinar a concentração de antibiótico utilizada na seleção de colônias mutantes foi testado o crescimento de *H. seropedicae* estirpes Z67, ZA95 e ZM152 na presença de concentrações crescentes do antibiótico espectinomicina. Cerca de  $10^8$  células foram plaqueadas em meio NFbHPN contendo 30, 50, 100, 300 ou 800 µg/ml do antibiótico. Após 48 horas de incubação a 30° C nenhuma colônia havia crescido na presença de 800 µg/ml de espectinomicina.

### 3.13. ENSAIO DE NITROGENASE

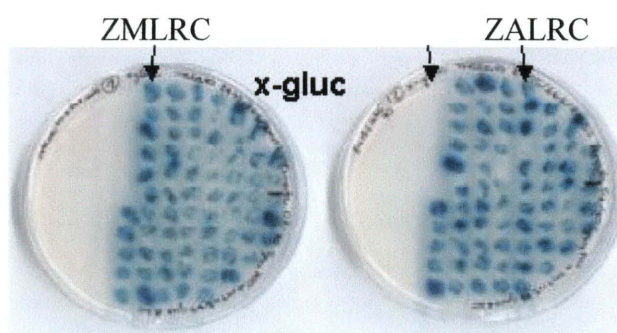
A atividade da nitrogenase das estirpes de *H. seropedicae* foi determinada pelo método de redução do acetileno (ARA) (BURRIS, 1972). Foram crescidas culturas de *H. seropedicae* durante 16h, a 30°C. Em seguida foram inoculados 30 µL de cultura em frascos contendo 4 mL de meio semi-sólido de NFbHP, com adição de 0,5 mmol/L de glutamato como fonte de nitrogênio. Depois de 24 h de incubação em estufa a 30°C, as estirpes foram acondicionadas em tubos fechados com rolhas de borracha. Nestes tubos foi injetado acetileno na concentração final de 10% (v/v). Após 1 hora de incubação a 30°C, foram retirados 0,5 mL da fase gasosa para determinação do etileno formado, por cromatografia gasosa.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. CONSTRUÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES DE *Herbaspirillum seropedicae* EXPRESSANDO CONSTITUTIVAMENTE O GENE *gusA*

Para obtenção de inserção do gene *gusA* no genoma de *H. seropedicae* o plasmídeo mTn5SSgusA20 foi eletroporado nas estirpes de *H. seropedicae* ZA95 e ZM152. O plasmídeo mTn5SSgusA20 contém o mini-transposon derivado do Tn5 clonado em vetor suicida, ou seja, o vetor não se replica, em *H. seropedicae*. Estirpes mutantes contendo o mini-transposon Tn5SSgusA foram selecionadas em meio NFbHPN contendo espectinomicina (Spm) na concentração de 800 µg/mL. Cerca de 100 colônias resistentes a Spm derivadas das estirpes ZA95 e ZM152, cresceram no meio de seleção após 48 horas (FIGURA 1). Seis mutantes de cada estirpe foram isolados e denominadas ZALRC1-6 (derivadas de ZA95) e ZMLRC1-6 (derivadas de ZM152)(FIGURA 2).

**FIGURA 1:** Expressão da  $\beta$ -glucuronidase nos mutantes ZMLRC e ZALRC

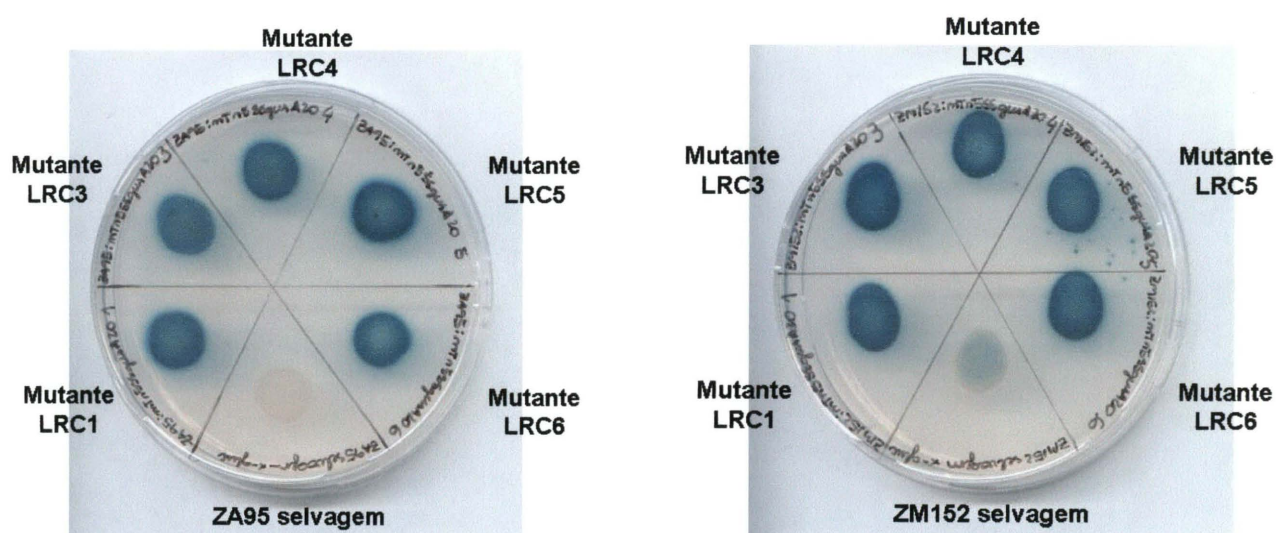


Estirpes que cresceram nas placas, após a eletroporação, foram repicadas para placas contendo meio NFbHPN com adição de Spm<sup>800</sup> e X-gluc para confirmar a inserção.

#### 4.2. DETECÇÃO DE ATIVIDADE DE $\beta$ -GLUCURONIDASE NAS ESTIRPES MUTANTES

As colônias mutantes foram inoculadas em meio NFbHPN sólido com X-gluc (30 mg/L). A enzima  $\beta$ -glucuronidase hidrolisa o substrato X-gluc produzindo 5-bromo-4-cloro-3-indol que, após reação de oxidação, precipita um produto de coloração azul. Após 24 horas de incubação a 30°C, todas as colônias adquiriram coloração azul, confirmando a inserção do mini-transposon Tn5SS*gusA* no genoma bacteriano (FIGURA 2). As estirpes mutantes ZALRC1 e ZMLRC1 foram, então, selecionadas e caracterizadas.

**FIGURA 2:** Expressão da  $\beta$ -glucuronidase nos mutantes ZMLRC e ZALRC



As estirpes mutantes (ZALRC1 e ZMLRC1) e selvagens (ZA95 e ZM152) de *H. seropedicae* foram crescidas em meio sólido NFbHPN contendo o substrato X-gluc (30  $\mu$ g/mL), durante 24 h, a 30°C.

#### 4.3. ATIVIDADE DE NITROGENASE E CRESCIMENTO NA PRESENÇA DE NITRATO

Como as estirpes contendo inserção do gene *gusA* deveriam ser utilizadas em experimentos de colonização de planta e avaliação da contribuição da bactéria para o balanço de nitrogênio da planta, a capacidade de fixar nitrogênio e de crescer em nitrato como fonte de nitrogênio foram avaliadas.

As estirpes mutantes não diferiram das selvagens em relação à atividade da enzima nitrogenase. Em presença de nitrogênio as estirpes selvagens e mutantes não apresentaram atividade da enzima nitrogenase. Na ausência de nitrogênio tanto as estirpes selvagens quanto as mutantes apresentaram atividade da enzima nitrogenase.

Também não houve diferença entre as estirpes selvagens e mutantes em relação ao crescimento utilizando nitrato de sódio como fonte única de nitrogênio (FIGURA 3). Estes resultados mostram que a inserção do transposon não interferiu na atividade da enzima nitrogenase nem na capacidade de utilizar nitrato como fonte de nitrogênio.

A ausência de efeito na atividade de redução de acetileno e no crescimento utilizando  $\text{NO}_3^-$  indica também que além dos genes que codificam para as enzimas das vias, os genes regulatórios do sistema Ntr (regulação do metabolismo do nitrogênio) não foram afetados pela inserção do transposon.



**FIGURA 3:** Crescimento das estirpes de *H. seropedicae* utilizando nitrato como fonte de nitrogênio



ZA95 selvagem

ZALRC1



ZM152 selvagem

ZMLRC1

As estirpes foram crescidas em meio NFbHP sólido, com adição de nitrato de sódio como única fonte de nitrogênio, durante 24 h, a 30°C.

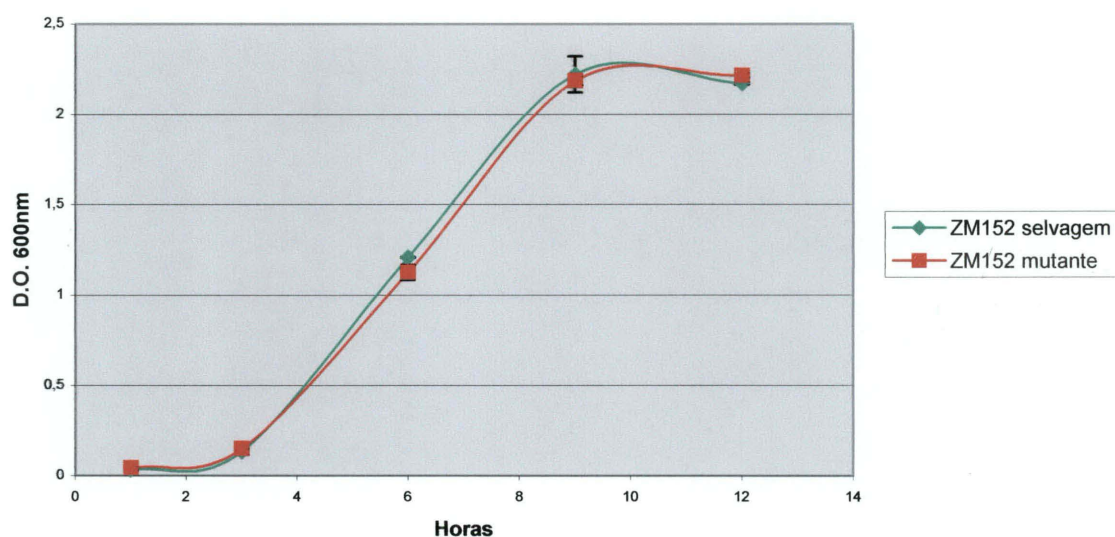
#### 4.4. CURVAS DE CRESCIMENTO

Para determinar se a inserção do mini-transposon nas estirpes ZALRC1 e ZMLRC1 causou alteração na taxa de crescimento das estirpes mutantes, uma curva de crescimento em meio NFbHPN foi construída. As estirpes mutantes e selvagens apresentaram curvas de crescimento semelhantes (FIGURAS 4 e 5), sugerindo que a inserção do mini-transposon



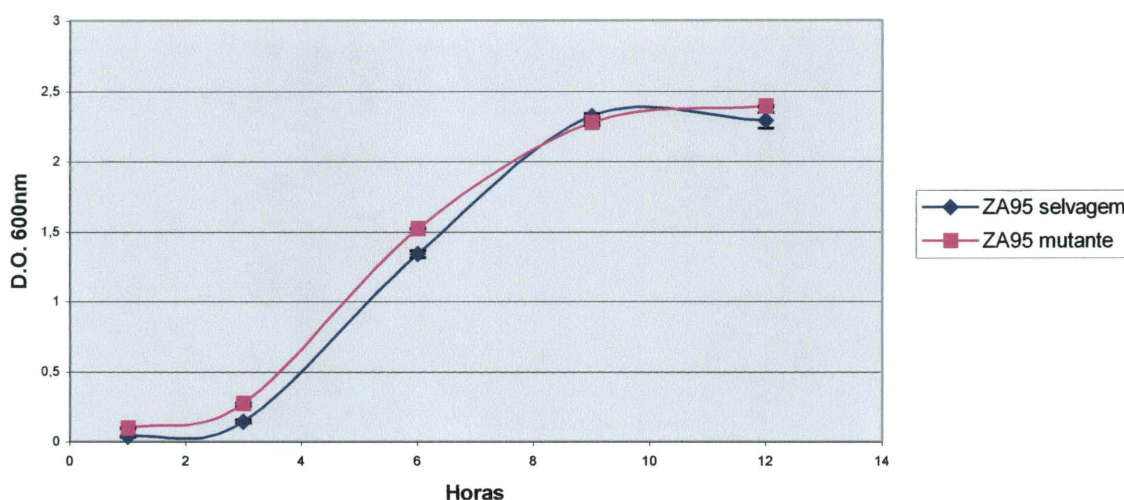
não inativou nenhum gene essencial para o crescimento de *H. seropedicae* nas condições de laboratório.

**FIGURA 4:** Curva de crescimento das estirpes selvagem ZM152 e mutante ZMLRC1 de *H. seropedicae*



As estirpes foram crescidas em meio líquido NFbHPN, sob agitação de 120 rpm, a 30°C e o crescimento foi determinado pela absorbância (600 nm) durante três, seis, nove e doze horas.

**FIGURA 5:** Curva de crescimento das estirpes selvagem ZA95 e mutante ZALRC1 de *H. seropedicae*

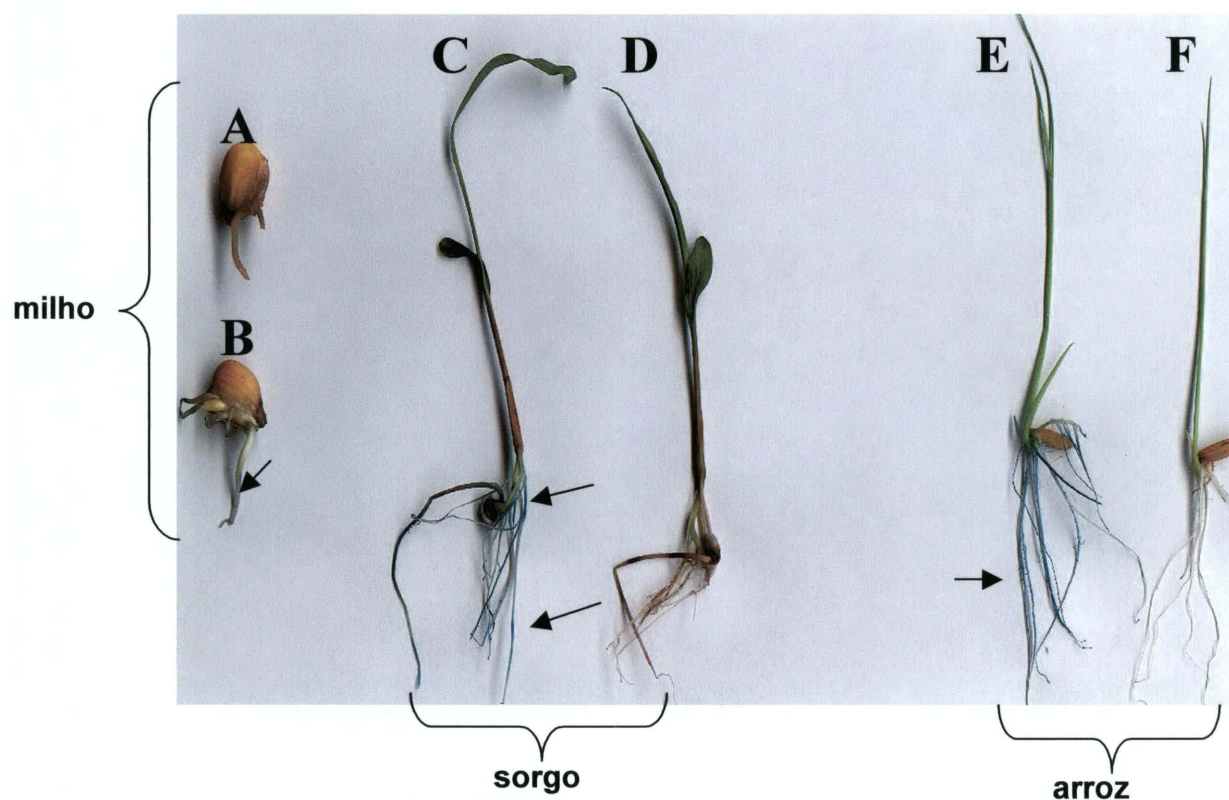


As estirpes foram crescidas em meio líquido NFbHPN, sob agitação de 120 rpm, a 30°C e o crescimento foi determinado pela absorbância (600 nm) durante três, seis, nove e doze horas.

#### 4.5. COLONIZAÇÃO DE PLANTAS DE MILHO, TRIGO, SORGO, ARROZ, TOMATE E FEIJÃO POR ESTIRPES DE *H. seropedicae* MARCADAS COM O GENE *gusA*

As estirpes mutantes foram inoculadas em plântulas de milho, trigo, sorgo, arroz, tomate e feijão. Após 15-20 dias de crescimento, as plantas foram colhidas e ensaiadas para atividade de beta-glucuronidase. Após incubação das raízes das plântulas com X-gluc (30µg/mL), uma forte coloração azul foi observada em alguns pontos das raízes de milho, trigo, sorgo e arroz (FIGURAS 6 e 7). Em tomate e feijão a coloração azul foi também observada nos cotilédones e no caule (FIGURAS 8 e 9) indicando que nesses locais houve colonização das bactérias mutantes e que estas expressaram o gene *gusA*.

**FIGURA 6:** Visualização da colonização superficial de raiz de gramíneas por *Herbaspirillum seropedicae*

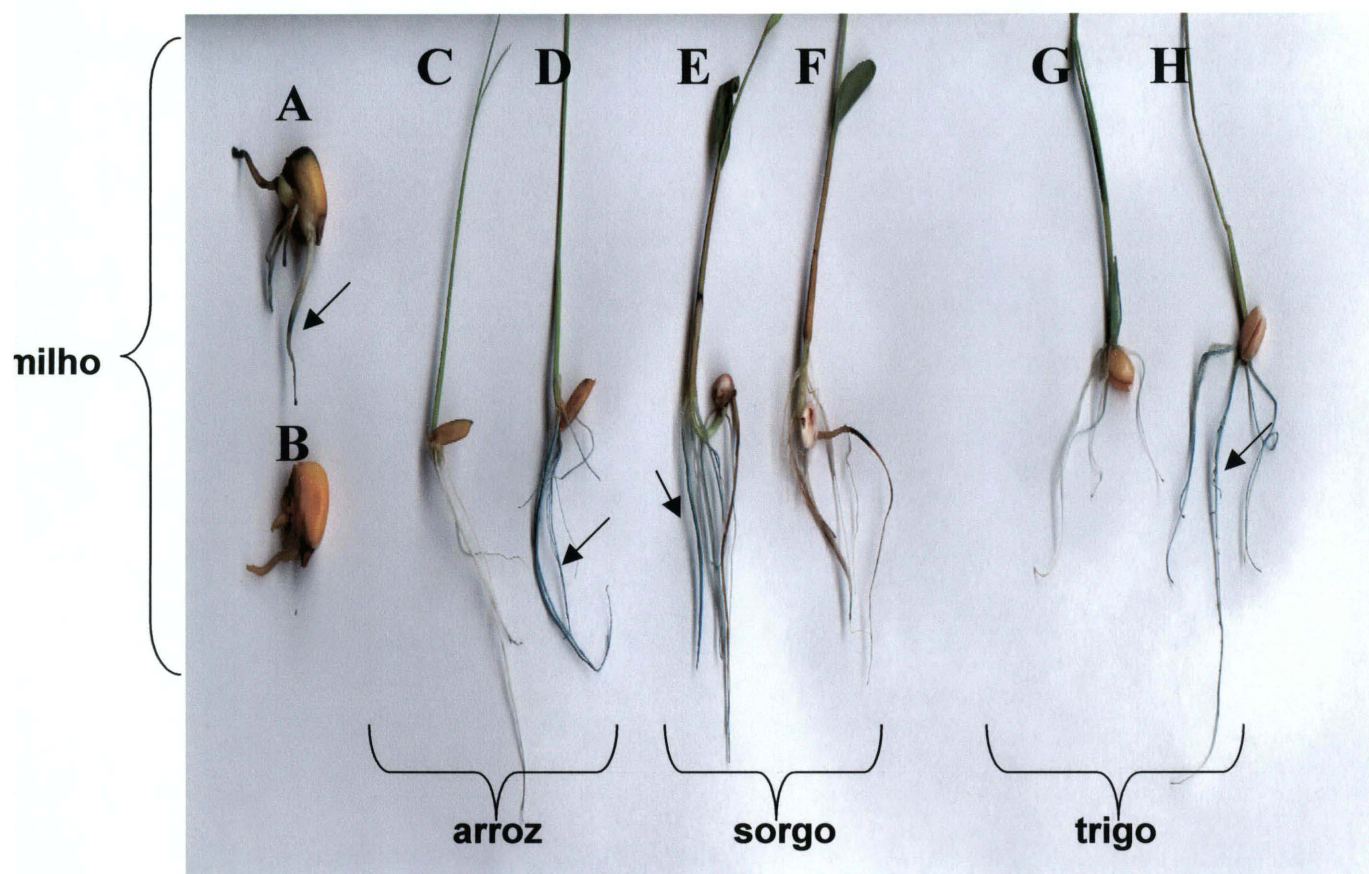


As plântulas foram inoculadas com  $10^8$  células e crescidas durante 15 dias. Após a coleta foram incubadas durante 30 h, a  $37^\circ\text{C}$ , em tampão cacodilato de sódio 50 mmol/L, pH 7,5, contendo 0,5 mg/mL de X-gluc.

**A, D e F** – Plântulas inoculadas com a estirpe selvagem ZM152; **B, C e E** - Plântulas inoculadas com a estirpe mutante ZMLRC1.



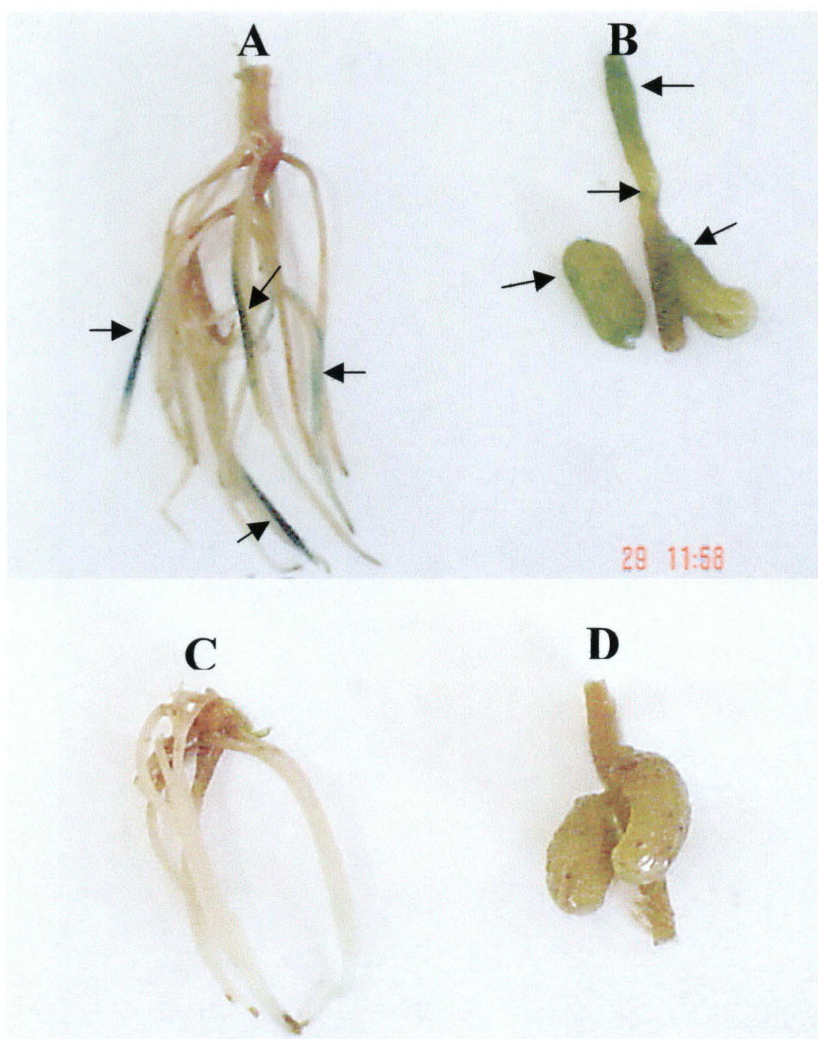
**FIGURA 7:** Visualização da colonização superficial de raiz de gramíneas por *Herbaspirillum seropedicae*



As plântulas foram inoculadas com  $10^8$  células e crescidas durante 15 dias. Após a coleta foram incubadas durante 30 h, a  $37^\circ\text{C}$ , em tampão cacodilato de sódio 50 mmol/L, pH 7,5, contendo 0,5 mg/mL de X-gluc.

**A, D, E e H** – Plântulas inoculadas com a estirpe mutante ZALRC1; **B, C, F e G** - Plântulas inoculadas com a estirpe selvagem ZA95.

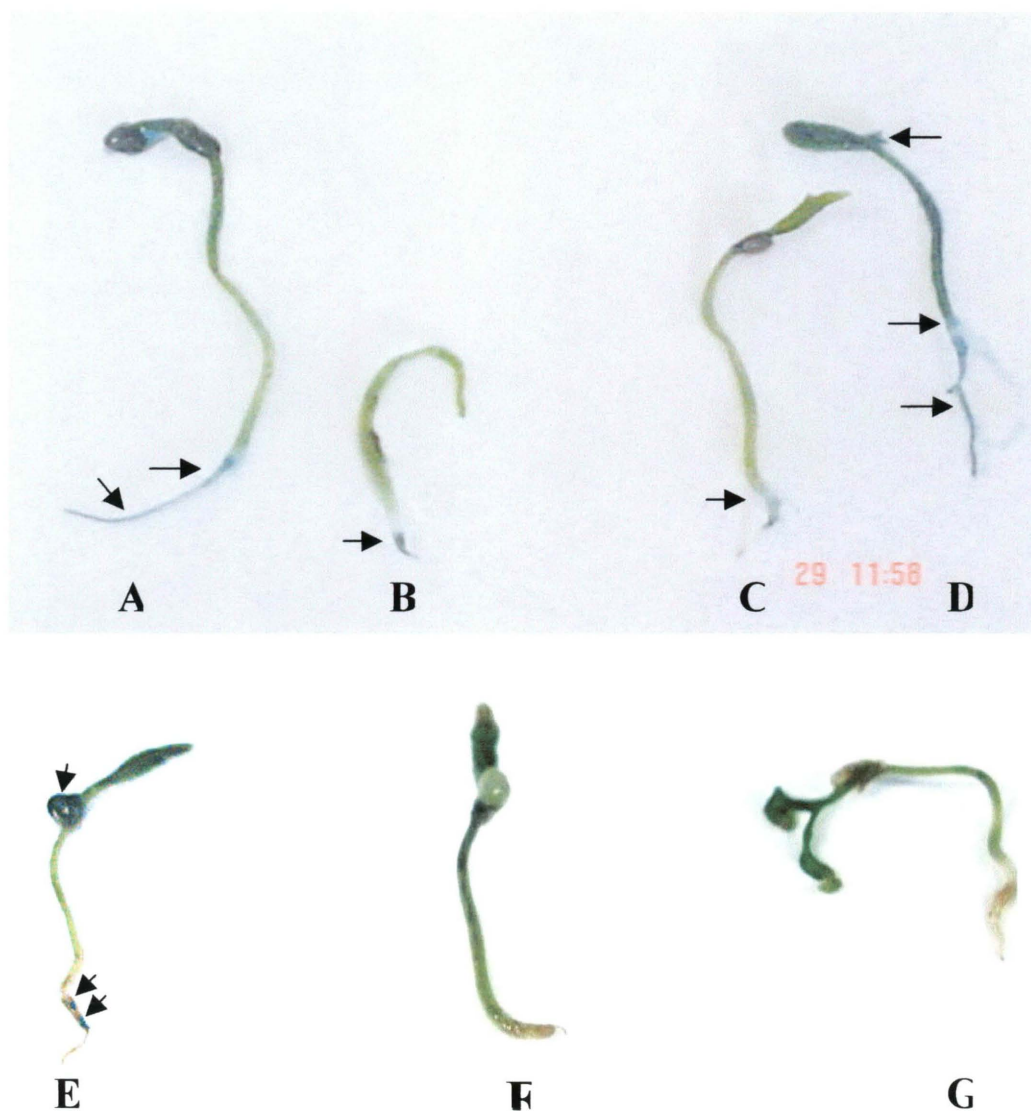
**FIGURA 8:** Visualização da colonização superficial de plântulas de Feijão por *Herbaspirillum seropedicae*



As plântulas foram inoculadas com  $10^8$  células e crescidas durante 10 dias. Após a coleta foram incubadas durante 30 h, a  $37^\circ\text{C}$ , em tampão cacodilato de sódio 50 mmol/L, pH 7,5, contendo 0,5 mg/mL de X-gluc.

**A** – Raiz de feijão inoculada com a estirpe mutante ZMLRC1; **B** – Parte aérea de feijão inoculada com a estirpe mutante ZMLRC1; **C** – Raiz de feijão inoculada com a estirpe selvagem ZM152; **D** – Parte aérea de feijão inoculada com a estirpe selvagem ZM152.

**FIGURA 9:** Visualização da colonização superficial de plântulas de tomate por *Herbaspirillum seropedicae*



As plântulas foram inoculadas com  $10^8$  células e crescidas durante 20 dias. Após a coleta foram incubadas durante 30 h, a  $37^\circ\text{C}$ , em tampão cacodilato de sódio 50 mmol/L, pH 7,5, contendo 0,5 mg/mL de X-gluc.

**A, B, C, D e E** – Plântulas de tomate inoculadas com ZALRC1; **F** – Plântula de tomate inoculada com ZA95; **G** – Plântula de tomate sem inoculação de *H. seropedicae*.



#### 4.6. CONTAGEM DE MICRORGANISMOS

As plântulas de feijão (10 dias após inoculação) e tomate (15 dias após inoculação), após desinfecção superficial com etanol (95%) seguido por hipoclorito de sódio (10%), foram trituradas e a suspensão foi plaqueada em meio NFbHPN para contagem de bactérias que colonizaram o interior do vegetal.

Foi observado o crescimento de colônias nas placas com diluição  $10^{-5}$ . Nem todas as placas desta diluição apresentaram UFC (unidades formadoras de colônia), mas a ausência de colônias não descarta a possibilidade da presença de bactérias endofíticas, indica que a diluição foi muito alta.

Para confirmar a identidade das colônias foi adicionado o substrato cromogênico da  $\beta$ -glucuronidase ao meio (diluição  $10^{-5}$ ) (FIGURA 10). Nestas placas foram identificadas especificamente as bactérias marcadas com *gusA* associadas endofiticamente.

O resultado da tabela 2 e 3 evidenciam:

1. O mutante ZALRC1 foi capaz de colonizar endofiticamente plantas de feijão e tomate, com número de bactérias de cerca de  $10^6$  UFC/g (feijão) a  $10^7$  UFC/g (tomate) de peso verde;
2. O mutante ZMLRC1 colonizou internamente feijão;
3. O grande número de bactérias endofíticas *gusA*<sup>-</sup> recuperadas das plantas de tomate e feijão sugerem que as sementes utilizadas possuíam um alto número de endófitos que não foram eliminados pela desinfecção utilizada.

Estes resultados, embora complicados pela presença de outras bactérias endofíticas, sugerem que *H. seropedicae* é capaz de penetrar e colonizar dicotiledôneas.

**Tabela 2:** Colonização endofítica de feijão por *H. seropedicae* 15 dias após inoculação

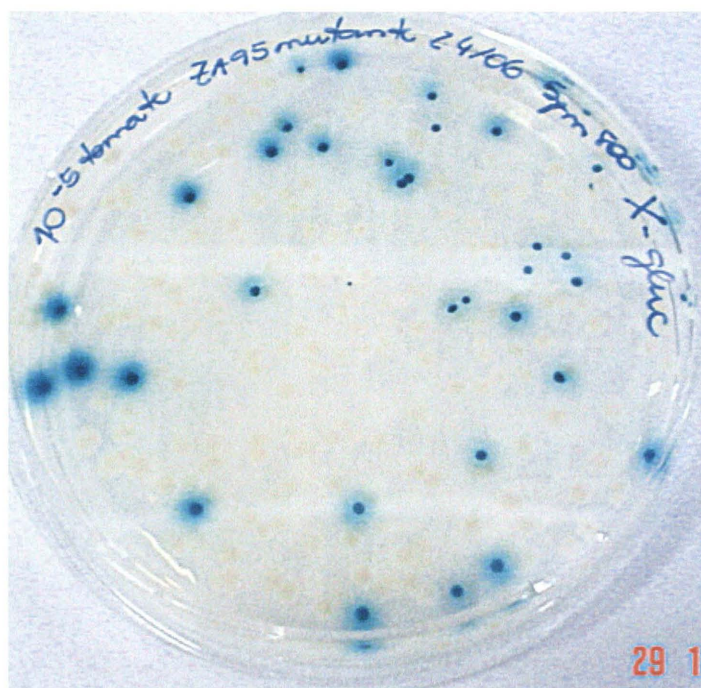
Estirpe	Localização	Peso verde do macerado (g)	UFC Total/g	UFC <i>gusA</i> +
ZA95 selvagem	Parte aérea	3,91	$0,3 \cdot 10^6$	-
ZALRC1(mutante)	Parte aérea	1,73	$4,8 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$
ZA95 selvagem	Raiz	0,95	-	-
ZALRC1(mutante)	Raiz	0,40	-	-
ZM152 selvagem	Parte aérea	2,11	$6,8 \cdot 10^6$	-
ZMLRC1 (mutante)	Parte aérea	3,72	$4,6 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$
ZM152 selvagem	Raiz	0,80	-	-
ZMLRC1 (mutante)	Raiz	0,42	-	-
Não inoculado	Parte aérea	2,20	$0,9 \cdot 10^6$	-
Não inoculado	Raiz	0,75	-	-

**Tabela 3:** Colonização endofítica de tomate por *H. seropedicae* 20 dias após inoculação

Estirpe	Peso verde do macerado (g)	UFC Total/g	UFC <i>gusA</i> +
ZA95 selvagem	0,17	$6,0 \cdot 10^7$	-
ZALRC1 (mutante)	0,12	$2,6 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^7$
ZM152 selvagem	0,11	$6,8 \cdot 10^7$	-
ZMLRC1 (mutante)	0,11	$1,8 \cdot 10^8$	-
Não inoculado	0,05	$1,8 \cdot 10^8$	-



**FIGURA 10:** Bactérias endofíticas do tomate inoculado com ZALRC1



Plantas de tomate desinfetadas superficialmente foram trituradas e diluídas ( $10^{-5}$ ) para serem plaqueadas em meio NFbHPN, com Spm<sup>800</sup> e X-gluc (30 $\mu$ g/mL).

## 5. CONCLUSÕES

- A inserção do transposon mTn5SS*gusA*20 resultou na mutagênese das estirpes ZM152 e ZA95 de *Herbaspirillum seropedicae*, sendo que tais mutantes ficaram marcados com o gene *gusA*.
- Os mutantes obtidos não diferiram das estirpes selvagens nas análises quanto ao crescimento em meio líquido NFbHPN, crescimento utilizando nitrato como fonte de N e atividade de nitrogenase.
- As estirpes mutantes ZALRC1 e ZMLRC1 foram capazes de colonizar a superfície de plântulas de milho, trigo, sorgo, arroz, tomate e feijão. A presença da bactéria foi evidenciada após incubação com o substrato da beta-glucuronidase, X-gluc.
- As estirpes ZA95, ZM152, ZALRC1 e ZMLRC1 de *H. seropedicae* colonizaram endofiticamente plântulas de feijão e tomate.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**. V. 36. P. 86-93.
- BALDANI, J. I.; PEREIRA, P. A. A.; ROCHA, R. E.; DÖBEREINER, J. 1981. Especificidade na infecção de raízes por *Azospirillum* spp. em plantas com via fotossintética C3 e C4. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. V. 16. P. 325-330.
- BALDANI, V.L.D. 1996. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. Seropédica: UFRRJ, 234 p. **Tese de doutorado**.
- BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. 1980. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biol. Biochem.** V. 12. P.433-439.
- BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L., CARUSI, M. V.; DEL GALLO, M.; VISCA, P. 1994. Phenotypic comparisons between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacea*. **Microbiology**. V. 140. P. 1069-1077.
- BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**. V.174. P. 195-209.
- BOTTOMLEY, P. 1992. Ecology of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. In: **Biological nitrogen fixation**. STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (eds.) (New York:Chapman and Hall). P. 293-348.
- BURRIS, R. H. 1972. Nitrogen-fixation – Assay methods and techniques. **Methods in Enzymology**. V. 24. P. 419-431.
- DIDONET, A. D. 1998. Resultados de pesquisa sobre a inoculação de trigo, cevada e milho com bactérias do gênero *Azospirillum*. Pesquisa em Andamento. **EMBRAPA – CNPT**: Passo Fundo. 10p.

- DÖBEREINER, J. 1988. Isolation and identification of root associated diazotrophs. **Plant and Soil**. V.110. P. 207-212.
- DÖBEREINER, J. 1992a. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions. Endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. **Ciência e cultura**, São Paulo. V. 44. P. 310-313,
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. 1995b. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. EMBRAPA:Brasília. 60p.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**. V. 43. P.895-914.
- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M.; KELLENBERG, E. 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**. V. 176. P. 1913-23.
- JACKSON, A.O.; TAYLOR, C.B. 1996. Plant-Microbe Interactions: Life and Death at the interface. **The Plant Cell**. V. 8. P. 1651-1688.
- JEFERSON, R. 1987. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**. V. 6. P. 3901-3907.
- KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; FUNAYAMA, S.; SOUZA, E.M.; RIGO, L.U. 1996. Isolation of DNA region of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. In: **XXV Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. (1996:Caxambu) Resumos, P.48.
- LADHA, J.K. DE BRUIJN, F. J.; MALIK, K. A. 1997. Introduction: assesing opportunities for nitrogen fixation in rice – a frontier project. **Plant and Soil**. V. 194. P. 1-10.
- LONG, S. & STASKAWICZ, B. J. 1993. Prokaryotic plant parasites. **Cell**. v. 73. P. 921-935.

- MESSING, J.; GRONENBORN, B.; MULLER-HILL, B.; HOF SCHNEIDER, P.H. 1977. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a *HindIII* fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form 'in vitro'. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**. v. 74. P. 3642-3648.
- METCALF, W.W. & WANNER, B.L. 1993. Construction of new beta-glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. **Gene**. V.129. p. 17-25.
- MYLONA, P.; PAWLOSKI, K.; BISSELING, T. 1995. Symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell**. v. 7. P. 869-885.
- OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. 1997. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**. V. 135. P. 723-737.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. 1996. Occurrence of endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**. V. 21. P. 197-200.
- SCHLOTTER, M.; WIEHE, W.; ASSMUS, B.; STEINDL, H.; BECKE, H.; HÖFLICH, G.; HARTMANN, A. 1997. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 63. P. 2038-2046.
- SEN, J. 1929. Is bacterial association a factor in nitrogen assimilation by rice plants? **Agric. J. India**. V. 24. P. 229-231.
- SMITH, R. S. 1992. Legume inoculant formulation and application. **Canadian Journal of Microbiology**. V. 38. P. 485-492.
- SOUZA, E. M. 1990. Clonagem, caracterização e seqüenciamento dos genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba: UFPR. 264p. **Tese de doutorado**.

- SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; MACHADO, H. B.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O. 1994. Effect of oxygen and ammonium on the expression of *nif A* and *nif B* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. In: **XXIII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular** (1994:Caxambu) Resumos, P. 57.
- STOLTZFUS, J. R.; SO, R.; MALARVITHI, P. P.; LADHA, J. K.; DE BRUIJN, F. J. 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil**. V. 194. P. 25-36.
- TORCH, P. & VANDERLEYDEN, J. 1996. Surface properties and motility of *Rhizobium* and *Azospirillum* in relation to plant root attachment. **Microbial Ecology**. V. 32. P. 149-169.
- TRIPLETT, E. W. & SADOWSKY, M. J. 1992. Genetics of competition for nodulation of legumes. **Annual Review of Microbiology**. V. 46. P. 399-428.
- VANDE BROEK, A.; MICHIELS, J.; VAN GOOL, A.; VANDERLEYDEN, J. 1993. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH* gene during association. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. V. 6. P. 592-600.
- VERMA, P. P. S.; HU, C. A.; ZANG, M. 1992. Root nodule development-origin, function and regulation of nodulin genes. **Physiologia Plantarum**. V. 85. P. 253-265.
- WERNER, D. 1992. Physiology of nitrogen fixing legume nodules: compartments and functions. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Eds.) **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall. 399-431.
- WILSON, K. J.; SESSITSCH, A.; CORBO, J. C.; GILLER, K. E. AKKERMANS. A. D. L.; JEFFERSON, R. A. 1995.  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. **Microbiology**. V. 141. P. 1691-1705.
- YOUNG, J. P. W. & JOHNSTON, A. W. B. 1989. The evolution of specificity in the legume *Rhizobium* symbiosis. **Trends in Ecology e Evolution** V. 4. P. 331-349.